

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Veronika Hrabalová

CHEMILUMINISCENČNÍ STANOVENÍ KOBALTU A JEHO APLIKACE

Chemiluminescence Determination of Cobalt and its Applications

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2015.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a připomínky, které mi po dobu řešení mé bakalářské práce poskytoval. Dále bych ráda poděkovala své babičce Štěpánce Rojové za pravopisnou korekci a celé své rodině za podporu, která mi byla poskytnuta při psaní této bakalářské práce.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací metody stanovení kobaltu (resp. kobaltnatých iontů) pomocí průtokové metody analýzy, takzvané sekvenční injekční analýzy (SIA). Jako detekční technika je použita chemiluminiscence, která je následně detekována při vhodné vlnové délce 443,68 nm citlivým spektrofotometrem. Pro analytické účely se zde využívá katalytické schopnosti kobaltnatých iontů při chemiluminiscenční reakci luminolu s peroxidem vodíku. Intenzita detekovaného chemiluminiscenčního záření je přímo úměrná koncentraci kobaltnatých iontů.

V souvislosti se stanovením kobaltu bylo nutné nejprve v SIA uspořádání optimalizovat některé významné parametry. Optimální koncentrace peroxidu vodíku byla 0,5 % a průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹. Dále byly optimalizovány průtokové rychlosti a reakční objemy luminolu a vzorku. Za optimálních podmínek byly zjištěny základní charakteristiky stanovení kobaltu. Limit detekce byl 0,29 mg.l⁻¹, citlivost stanovení byla 481 l.mg⁻¹. Dále byla studována katalytická schopnost dalších 7 prvků, resp. jejich iontů (Cu²⁺, Cr³⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Mn⁴⁺, Ag⁺ a Ni²⁺). Tato studie byla provedena z hlediska možných interferencí při stanovení kobaltu. Z výše uvedených iontů, pouze ionty Cu²⁺ vykazovaly katalytický účinek, který byl ovšem nevýznamný oproti iontům Co²⁺. Při studiu vlivu jednotlivých iontů v přítomnosti kobaltnatých iontů na stanovení kobaltu byl zjištěn významný inhibiční účinek i iontů Cr³⁺ a Ag⁺, kterého bylo využito k nepřímému stanovení těchto iontů.

Dále byly studovány rozklady vitamínu B₁₂. Po vyvázání kobaltnatých iontů z molekuly, lze pomocí chemiluminiscence stanovit obsah vitamínu B₁₂ ve vzorku. Nejvyšší účinnosti rozkladu bylo docíleno pomocí povaření s koncentrovanou kyselinou dusičnou. Naopak při rozkladu pomocí UV záření za přítomnosti oxidačního činidla nebylo dosaženo žádné účinnosti, což je v rozporu s prací J.A.M. Pulgarína⁽²⁷⁾.

Klíčová slova

Sekvenční injekční analýza

Chemiluminiscence

Luminol

Stanovení Co²⁺

Stanovení vitamínu B₁₂

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

$c_{(\text{Co}^{2+})}$	koncentrace roztoku kobaltu
$c_{(\text{H}_2\text{O}_2)}$	koncentrace roztoku peroxidu vodíku
$c_{(\text{lum})}$	koncentrace luminolu
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
t_{intg}	integrační čas
UV	ultrafialové záření (Ultraviolet)
$V_{(\text{Co}^{2+})}$	objem roztoku kobaltu
$v_{(\text{Co}^{2+})}$	průtoková rychlost kobaltu
$v_{(\text{H}_2\text{O}_2)}$	průtoková rychlost peroxidu vodíku
$v_{(\text{lum})}$	průtoková rychlost luminolu
$V_{(\text{lum}+\text{Co}^{2+})}$	objem směsi luminol a vzorek
$v_{(\text{vz}+\text{lum})}$	průtoková rychlost směsi vzorek a luminol
VIS	viditelné záření (Visible)

Obsah

1. CÍLE PRÁCE	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Průtokové metody.....	8
2.2. FIA.....	8
2.3. SIA.....	9
2.4. Chemiluminiscence.....	11
2.5. Luminol.....	12
2.6. Vitamin B ₁₂	13
2.7. Možnosti rozkladu vitaminu B ₁₂	14
2.7.1. Rozklad vitaminu B ₁₂ pomocí HCl.....	14
2.7.2. Rozklad vitaminu B ₁₂ pomocí HNO ₃	14
2.7.3. Rozklad vitaminu B ₁₂ pomocí UV záření	14
2.8. Statistické zpracování výsledků	15
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1. Přístrojové vybavení a instrumentace	16
3.2. Použité chemikálie.....	17
3.3. Příprava roztoků	18
3.4. Aparatura pro SIA stanovení.....	19
4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	21
4.1. Optimalizace průtokových rychlostí (luminol + vzorek).....	21
4.2. Optimalizace průtokové rychlosti peroxidu vodíku.....	22
4.3. Optimalizace koncentrace peroxidu vodíku.....	23
4.4. Reakční čas.....	24
4.5. Optimalizace reakčních objemů luminolu a vzorku.....	24
4.6. Souhrn optimalizovaných parametrů.....	25
4.7. Základní charakteristiky stanovení kobaltu.....	25
4.8. Katalytická schopnost dalších iontů	27
4.9. Kalibrační křivka Cr ³⁺	28
4.10. Kalibrační přímka Ag ⁺	29
4.11. Rozklady vitaminu B ₁₂	30
4.11.1. Rozklad pomocí HCl	30
4.11.2. Rozklad pomocí HNO ₃	31
4.11.3. Rozklad pomocí UV záření.....	32
5. ZÁVĚR	34
6. BIBLIOGRAFIE.....	35

1. CÍLE PRÁCE

Sekvenční injekční analýza je významná instrumentální metoda analytické chemie. Měření probíhá v proudícím prostředí, jehož složení se mění na základě reakce analytu s vhodným reakčním činidlem. V tomto případě jsou analytem kobaltnaté ionty a reakční směs je luminol s peroxidem vodíku. Proudící prostředí zajišťuje promísení reakčních zón a transport produktů do detekčního systému. Detektor zaznamenává intenzitu chemiluminiscenčního záření. Kobaltnaté ionty vykazují katalytickou schopnost při chemiluminiscenční reakci luminolu s H_2O_2 a lze stanovit jejich obsah v roztoku díky tomu, že intenzita chemiluminiscenčního záření je přímo úměrná koncentraci kobaltnatých iontů.

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat metodu stanovení kobaltnatých iontů reakcí s luminolem a peroxidem vodíku v průtokovém uspořádání technikou sekvenční injekční analýzy (SIA). Konkrétně optimalizace průtokové rychlosti peroxidu vodíku a reakční směsi, koncentrace peroxidu vodíku a objemy luminolu a vzorku. Dalším cílem bylo zjistit základní charakteristiky pro stanovení kobaltnatých iontů. Dále bylo cílem práce studium interferenčního vlivu dalších iontů (Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{4+} , Ag^+ a Ni^{2+}). Měření těchto iontů bylo prováděno samostatně v roztoku i společně s kobaltnatými ionty.

Chemiluminiscenční metoda lze aplikovat na stanovení vitamínu B_{12} . Kobaltnaté ionty lze stanovit po rozkladu molekuly vitamínu B_{12} . Dalším cílem této práce bylo tedy najít optimální způsob vyvázání kobaltnatých iontů z vitamínu B_{12} pro jejich následné stanovení chemiluminiscenční metodou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Průtokové metody

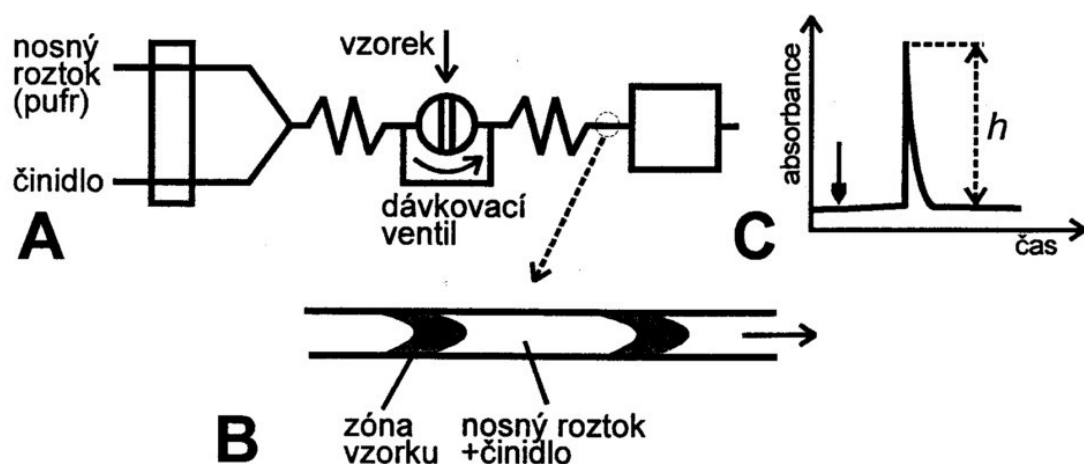
Současná praxe vyžaduje od analytické chemie značné množství analýz s dostatečnou přesností, citlivostí, spolehlivostí a především rychlostí při minimálních nárocích na lidskou práci a cenu jedné analýzy. Klasické analytické postupy toto vše nemohou zajistit. Používají se proto různé druhy instrumentálních technik.

Nesmírnou výhodou průtokových metod je možnost kontinuálně sledovat koncentraci určité složky. Další výhodou je možnost automatizace celé metody nebo jen dílčích kroků. Technika SIA umožňuje rychle a spolehlivě analyzovat velké množství vzorků. Snižuje se také kontakt pracovníků laboratoře s chemickými, v některých případech zároveň i toxickými látkami a analyt lze stanovit bez jakékoli předchozí úpravy vzorku. Průtokové metody nachází široké uplatnění v potravinářských, environmentálních, klinických a farmaceutických analýzách ⁽¹⁾.

Průtokové metody jsou tedy významnou částí skupiny instrumentálních technik v analytické chemii. Měření probíhá v proudícím prostředí, jehož složení se mění na základě reakce analytu s vhodným reakčním činidlem. Proudící prostředí zajišťuje promísení reakčních zón a transport produktů do detekčního systému. Průběh reakce zaznamenávaný detektorem má tvar píku, jehož výška h závisí na koncentraci. Právě na detektor a chování měřicího systému jsou při této metodě kladeny vysoké požadavky. Je potřeba, aby bylo co nejrychleji a nejúčinněji dosaženo reakce na změny v protékajícím analyzovaném prostředí. Jako detekční systém je v případě průtokových metod průtoková cela spojená s UV-VIS detektorem nebo fluorimetrem. Dále se využívá i elektrochemická detekce (ISE, amperometrie) ⁽²⁾.

2.2. FIA

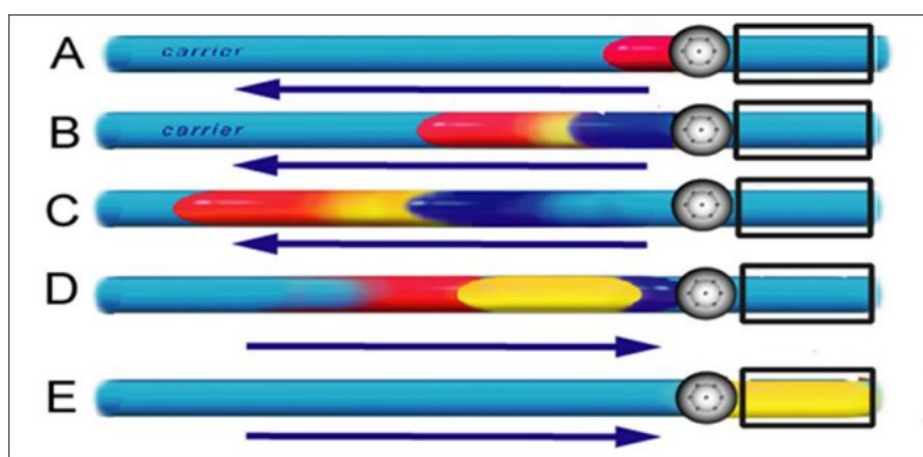
Průtoková injekční analýza (FIA) byla poprvé představena jako analytická metoda roku 1975 J. Růžičkou a E. Hansenem ⁽³⁾. Schéma základního uspořádání průtokové injekční analýzy je zobrazeno na obr. 2.1. Principem FIA je dávkování vzorku do kontinuálního proudu nosné kapaliny. Nosná kapalina může být činidlo, pufr či pouze čistá voda. Tok kapaliny je zajišťován peristaltickou pumpou. Pokud je nosnou kapalinou reakční činidlo, dochází v okamžiku nadávkování vzorku ke vzniku reakčních produktů. Ty jsou následně vedeny do průtokové cely detektoru. Avšak dochází pouze k částečnému smíšení vzorku a činidla, takže roztok vstupuje do detektoru před dosažením chemické rovnováhy.



Obr. 2.1 Průtoková injekční analýza. Schématické zakreslení možného experimentálního uspořádání (A), charakter toku roztoku s nadávkovanými vzorky (B) a příklad odezvy (C). Otočením dávkovacího ventilu se do proudu roztoku nadávkuje jeho obsah ⁽⁴⁾.

2.3. SIA

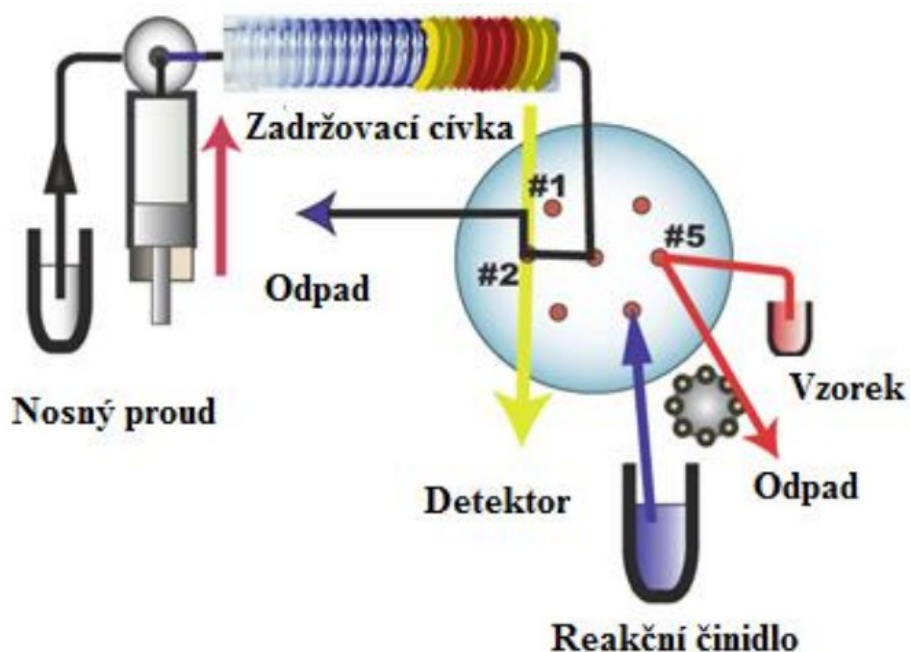
Sekvenční injekční analýza byla vyvinuta na začátku devadesátých let v důsledku odstraňování nedostatků spojených s FIA uspořádáním. Za jejím zrodem stál opět J. Růžička z Washingtonské univerzity ⁽⁵⁾. Kontinuální průtokové systémy mohou sice fungovat dobře i bez pomoci počítače, ale jsou neekonomické z hlediska spotřeby činidla a neekologické z hlediska množství odpadu, protože všechny roztoky jsou čerpány současně. Naopak sekvenční vstřikování je založeno na kombinovaném toku nosné kapaliny, který je řízen počítačem. Tím je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na výsledný produkt ⁽⁶⁾.



Obr 2.2: Princip změny toku při sekvenční injekční analýze ⁽⁷⁾. Fáze A-E jsou popsány níže v textu.

Červeně je na obr. 2.2 znázorněna zóna nadávkovaného vzorku a modře reakční směsi. Fáze A znázorňuje dávkování roztoků, fáze B-C průběh reakce. Otočení směru toku a vznik produktů, které jsou na obrázku znázorněny žlutě lze vidět ve fázi D. Ve fázi E jsou produkty vedeny do detekční cely a je měřen příslušný analytický signál.

Základní systém sekvenční injekční analýzy (obr. 2.3) se skládá z dvousměrného pístového čerpadla, zadržovací cívky, vícecestného selekčního ventilu, detektoru a počítače. Počítač je synchronizován s ovládáním čerpadla a vícecestného selekčního ventilu. Tímto způsobem je možné definovat přesné objemy a směr toku roztoků ⁽⁸⁾.



Obr. 2.3.: Schéma aparatury pro sekvenční injekční analýzu ⁽⁷⁾

V typickém analytickém cyklu jsou nejprve nadávkovány jednotlivé zóny pomocí vícecestného selekčního ventilu do zadržovací cívky. Díky naprogramovaným pohybům pístu čerpadla synchronizovaným s přepínáním pozic vícecestného selekčního ventilu se generuje definovaný tok nosného roztoku. Dochází k překryvu reakčních zón a vzniklý produkt putuje k detektoru.

Se vzrůstajícími potřebami kontroly kvality životního prostředí, potravin a léčiv, s požadavky na rychlost a spolehlivost diagnostických metod v medicíně a biologickém výzkumu, a na racionalizaci řízení technologických procesů se jeví SIA jako jedna z nadějných alternativ, umožňujících provádět analýzy velkých sérií vzorků s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí ⁽⁹⁾.

Volba detektorů závisí pouze na typu chemické reakce použité ke stanovení daného analytu. Nejčastěji bývají využívány detektory spektrofotometrické ⁽¹⁰⁾ spektrofluorimetrické a elektrochemické ⁽¹¹⁾. Výsledný signál má stejně jako u FIA tvar píku ⁽⁹⁾.

2.4. Chemiluminiscence

Chemiluminiscence je záření vyvolané chemickým dějem při teplotách obvykle nižších než 500 °C. Je způsobena přenosem reakční energie na atomy, nebo molekuly, které tím přecházejí do aktivovaného stavu energeticky bohatšího. Získanou energii pak takové aktivované atomy nebo molekuly vyzáří ve formě světla ⁽¹²⁾. Chemiluminiscence je druh luminiscence. Ta se dělí podle typu budící energie. Další druhy luminiscence jsou shrnuty v tab. 2.1 Pojem luminiscence zahrnuje jak fluorescenci, tak fosforescenci. Fluorescence je definována jako emise světla s krátkým (10^{-8} s) dohasínáním po ukončení excitace.

Luminofor, látka schopná světélkování, přijme energii a dojde k excitaci na vyšší energetickou hladinu. Při následné deexcitaci na základní energetickou hladinu dojde k vyzáření energie ve formě světla ⁽¹³⁾.

Tab. 2.1: Klasifikace luminiscenčních dějů ⁽¹³⁾

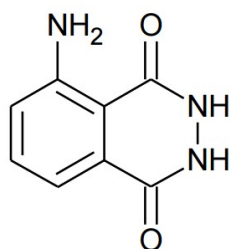
Druh luminiscence	Budící energie
Radioluminiscence	krátkovlnné elektromagnetické záření – např. γ , rentgenové atd.
Termoluminiscence	tepelná
Elektroluminiscence	elektrická
Katodová luminiscence	elektrony urychlené v elektrickém poli
Triboluminiscence	mechanická – tření, stlačování apod.
Chemiluminiscence	chemická reakční
Fotoluminiscence	světelné záření, popř. UV záření
Sonoluminiscence	ultrazvuk

Nejznámějším příkladem chemiluminiscence je světélkování žlutého fosforu nebo Grignardova činidla při jeho pozvolné oxidaci na vzduchu za chladu ⁽¹²⁾. V této práci je uplatněna oxidace luminolu v alkalickém prostředí s peroxidem vodíku za přítomnosti katalyzátoru, při které vzniká modré záření.

Luminiscence je hojně využívána k analýze DNA, proteinů či polutantů ovzduší jako oxidů dusíku (NO_x), ozonu (O_3), či některé organofosfáty jako bojové plyny ⁽¹³⁾.

2.5. Luminol

Luminol (systematický název 5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) je světle žlutá krystalická látka s omezenou rozpustností ve vodě. Jeho chemiluminiscenční vlastnosti poprvé popsal Albrecht roku 1928 ⁽¹⁴⁾. Huntress roku 1934 ⁽¹³⁾ poprvé publikoval metodu syntézy sloučeniny z kyseliny 3-nitroftalové a hydrazin sulfátu a tuto sloučeninu pojmenoval luminol.



Obr. 2.4.: Strukturní vzorec luminolu

Luminol je významná látka pro chemiluminiscenční reakce a stejně tak pro výzkum chemiluminiscence samotné ⁽¹³⁾. Roztok luminolu je citlivý na světlo a přítomnost kovových kationtů; typicky jsou stabilní pouze 8-12 hodin. Bylo prokázáno, že luminol je tepelně nestabilní, a proto by měl být při skladování chráněn před vysokými teplotami ⁽¹⁴⁾. V kyselém prostředí se proto luminol vyskytuje v plně protonizované formě jako (LH_2) a v bazickém prostředí od $\text{pH} > 7$ se nachází v monodeprotonizované (LH^-) či plně deprotonizované (L^{2-}) formě ⁽¹⁵⁾.

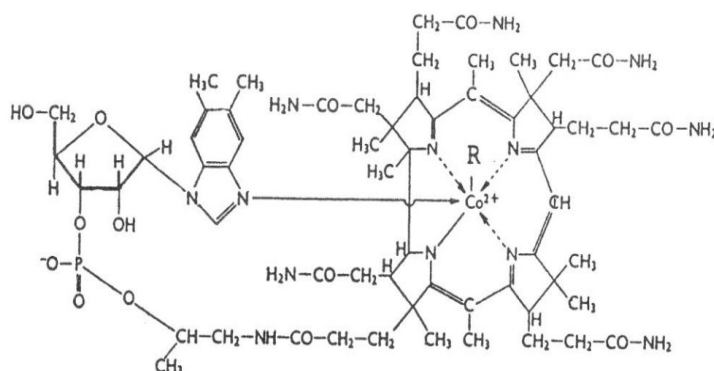
Tab. 2.2: Fyzikálně chemické vlastnosti luminolu

Molekulová hmotnost	177,16 g.mol ⁻¹
Bod tání	319°C
pK _{a1}	6,74
pK _{a2}	15,1
Rozpustnost ve vodě	<0,1 g/ 100 ml za normálních podmínek

Několik let po objevení luminolu v roce 1928 se našlo jeho uplatnění v kriminalistice (detekce stop krve, popř. jiných tělních tekutin), později i v biochemii a biologii. Hemoglobin obsahuje železnaté kationty, které jsou už v malé koncentraci schopny katalyzovat reakci luminolu. I po několikerém umytí zůstávají na kobercích nebo podlahách stopy krve, běžnému oku neviditelné. Ovšem po nanesení reakční směsi s luminolem se potřísněná místa intenzivně rozzáří. Stejného principu využívají i myslivci k dohledání poraněné zvěře. Spolehlivost detekce je však ovlivněna tím, že reakce luminolu může být katalyzovaná i dalšími látkami (obsahující např. kationty měďnaté, manganaté, kobaltnaté, železité). Vzhledem k těmto a dalším nežádoucím vlivům je luminol v kriminalistice nahrazován jinými látkami ⁽¹³⁾.

2.6. Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂, nazývaný jako kobalamin, je molekula, jejímž základem je korinový kruh. V centru tohoto komplexu je vázán dvojmocný kobalt ⁽¹⁶⁾. Objasnění struktury vitaminu B₁₂ trvalo poměrně dlouho, až do roku 1957 ⁽¹⁷⁾. Návrh syntézy vitaminu B₁₂ byl poprvé publikován roku 1973 po desetileté práci skupin pracovníků, které vedli R.B. Woodward a A. Eschenmoser ⁽¹⁸⁾.



Obr. 2.5: Strukturní vzorec vitaminu B₁₂

Vitamin B₁₂ se řadí mezi esenciální složky, tudíž tělo savců jej nemůže syntetizovat. Proto je nezbytné ho přijímat v potravě. Existují však řasy, houby a mikroorganismy, které jsou schopny si ho samy syntetizovat ⁽¹⁹⁾.

Vitamin B₁₂ se stanovuje pomocí různých analytických metod, jako například spektrofotometricky (LOD = 2 ppb) ⁽²⁰⁾, pomocí AAS (LOD = 10 µg.ml⁻¹) ⁽²¹⁾ a voltametricky (LOD = 3,3.10⁻⁷ mol.l⁻¹) ⁽²²⁾. Ke stanovení vitaminu B₁₂ v komplikovaných biologických matricích napomohl vývoj analytických metod jako např. HPLC ^{(23),(24)}.

2.7. Možnosti rozkladu vitamínu B₁₂

Při chemiluminiscenční metodě se stanovuje iont Co²⁺, který je přítomný v struktuře vitamínu B₁₂. Ke stanovení vitamínu B₁₂ je tedy zapotřebí nejprve vyvázat iont Co²⁺ z jeho struktury.

2.7.1. Rozklad vitamínu B₁₂ pomocí HCl

Song a Hou ve své práci použili 0,1M kyselinu chlorovodíkovou pro rozklad 0,5 mg vitamínu B₁₂. Směs chemikálií převedli do 25 ml odměrné baňky a doplnili po rysku. Takto připravený roztok byl ihned proměřen. Efektivita rozkladu vitamínu B₁₂ dle autorů byla 99,34 – 101,37% ⁽²⁵⁾.

2.7.2. Rozklad vitamínu B₁₂ pomocí HNO₃

Han a Zhang k rozkladu vitamínu B₁₂ použili koncentrovanou HNO₃. Směs 5 ml HNO₃ a 1 ml vitamínu B₁₂ nechali povařit na varné lázni až do jejího úplného vypaření. Po vychladnutí na pokojovou teplotu rozpustili reziduum v malém množství destilované vody a proměřili obsah uvolněných Co²⁺. V jejich práci není uvedena koncentrace použitých reálných vzorků vitamínu B₁₂ ani účinnost rozkladu ⁽²⁶⁾.

2.7.3. Rozklad vitamínu B₁₂ pomocí UV záření

Ve své práci Pulgarín a kol. k rozkladu vitamínu B₁₂ použili přídavek roztoku peroxodisíranu draselného (K₂S₂O₈) jako oxidačního činidla. Vzniklá směs byla následně ozařována UV lampou. Autoři článku použili ke stanovení preparáty vitamínu B₁₂ o koncentraci 500 až 5000 mg.l⁻¹. Jako optimální podmínky rozkladu vitamínu B₁₂ autoři vybrali c_(K₂S₂O₈) = 0,92 mmol.l⁻¹ s dobou ozařování 1 minuta. Dle naměřených výsledků byl rozklad vitamínu B₁₂ proveden s 97% úspěšností ⁽²⁷⁾.

2.8. Statistické zpracování výsledků

Každé měření, tedy i chemická analýza, je zatíženo určitou chybou. V této práci bylo každé měření provedeno třikrát. Z těchto hodnot byl vybrán medián jako střední hodnota naměřeného signálu a ze všech naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka, která je zobrazována jako chybová odchylka hodnoty v grafických zobrazeních.

Medián

Medián je střední hodnotou měření. Výsledky se seřadí podle velikosti – při lichém počtu je medián prostřední hodnota, při sudém počtu aritmetický průměr dvou prostředních. Je vhodné jej využívat k odhadu střední hodnoty při malém počtu analytických výsledků ⁽⁴⁾.

Odhad směrodatné odchylky

Odhadnutá směrodatná odchylka charakterizuje šířku intervalu, v němž se mohou vyskytnout výsledky opakovaného měření.

$$s = k_n R$$

k_n je tabelovaný koeficient a $R = x_{max} - x_{min}$ je rozpětí (rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty x). Čím je směrodatná odchylka menší, tím je výsledek měření přesnější ⁽⁴⁾.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je nejnižší hodnota měření, při které můžeme určit, že se daný analyt vyskytuje ve vzorku. Její hodnota je trojnásobek hodnoty směrodatné odchylky šumu.

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší hodnota měření, při které jsme schopni určit koncentraci analytu ve vzorku. Její hodnota je desetinásobek hodnoty směrodatné odchylky šumu.

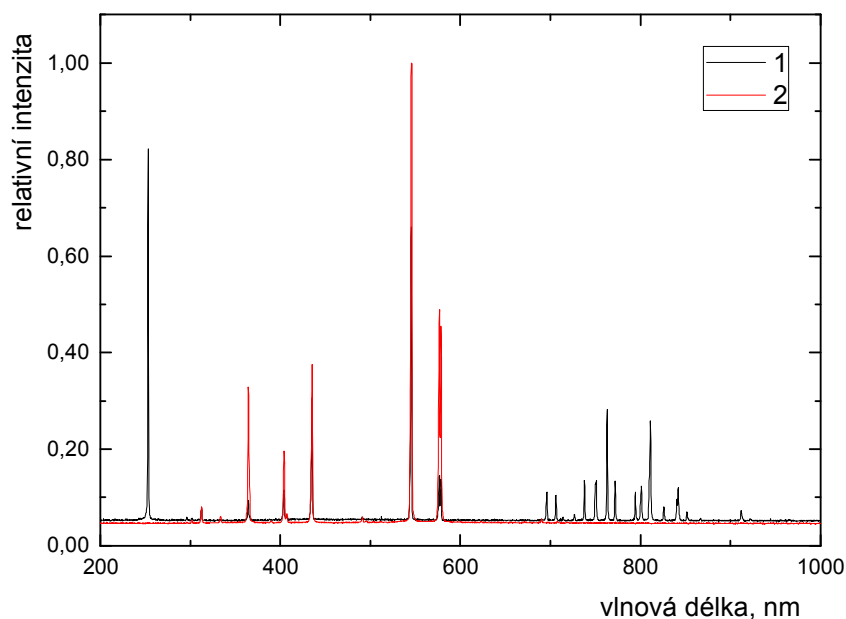
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístrojové vybavení a instrumentace

- Spektrofotometr QE65000 (Ocean Optics, USA) s optickým vláknem QP-600-2-UV/VIS-SR (Ocean Optics, USA) o průměru 600 μm jako detektor pro měření intenzity chemiluminiscence, průtoková detekční cela o délce absorpčního prostředí 1,0 cm
- FIALab-3500 Sequential and Flow Injection Analyzer (FIALab, USA)
- Počítač Dell Optiplex 790 vybavený softwarem SpectraSuite (Ocean Optics, USA) a softwarem FIALab for Windows 5 pro ovládání SIA aparatury.
- Zařízení pro ozařování vzorku UV zářením PSA S570U100 UV/Heating speciation (P S Analytical, USA), viz obr. 3.1 a emisní spektrum této výbojky (1) ve srovnání s klasickou nízkotlakou Hg výbojkou (2) (obr. 3.2)
- Peristaltické čerpadlo REGLO-CPF Digital (Ismatec, Německo), viz obr. 3.1



Obr. 3.1: Aparatura pro ozařování vzorku pomocí UV záření



Obr. 3.2: Srovnání emisních spekter výbojky 1 – krakovací jednotka PSA S570U100 UV/Heating Module a 2 – klasická nízkotlaká Hg výbojka

3.2. Použité chemikálie

- Luminol (3-aminophthalhydrazide); čistota 97%; (Sigma – Aldrich, USA)
- H_2O_2 30%, čistota p.a.; $M_r = 34,02$ g/mol (Lach – Ner, s.r.o., Neratovice)
- $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, čistota p.a., $M_r = 281,10$ g/mol, (Lach – Ner, s.r.o., Neratovice)
- Vitamin B12, čistota 98,5%; (Sigma – Aldrich, USA)
- Na_2CO_3 bezvodý, čistota p.a.; $M_r = 105,99$ (Lachema Brno, ČR)
- NaHCO_3 ; čistota p.a., $M_r = 84,01$ (Lachema Brno, ČR) 30
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; čistota p.a., (Lachema Brno, ČR)
- NaOH , čistota p.a.; $M_r = 39,99$ (Lachema Brno, ČR)
- HNO_3 65%, pro analýzu EMSURE® ISO (Merck Millipore, USA)
- HCl 37%, ACS reagent, $M = 36,46$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Roztoky iontů Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{4+} , Ag^+ a Ni^{2+} o koncentraci 1000 mg.l^{-1} , připraveny rozpuštěním pevných solí těchto iontů (Lach – Ner, s.r.o., Neratovice)

3.3. Příprava roztoků

- *Příprava 50 ml 16,9 mmol.l⁻¹ roztoku luminolu o pH 9,00 v uhličitanovém pufru:*

Roztok luminolu v uhličitanovém pufru byl připraven podle návodu O. Šimůnka ⁽²⁸⁾. V 30 ml destilované vody bylo nejprve rozpuštěno 0,2 g Na₂CO₃ a 0,15 g luminolu, poté bylo přidáno 1,2 g NaHCO₃ a 2,5 g (NH₄)₂CO₃. Vše bylo důkladně promícháno a rozpouštění chemikálií bylo usnadněno použitím sonifikace. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku. pH roztoku bylo upravováno přidávkou pevného NaOH za stálého měření pH-metrem.

- *Příprava 500 ml 0,5% H₂O₂:*

Do 500 ml odměrné baňky byla přidána destilovaná voda, pomocí automatické pipety bylo odpipetováno 8,33 ml 30% H₂O₂. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

- *Příprava 50 ml standardního roztoku Co²⁺ o koncentraci 1000 mg.l⁻¹:*

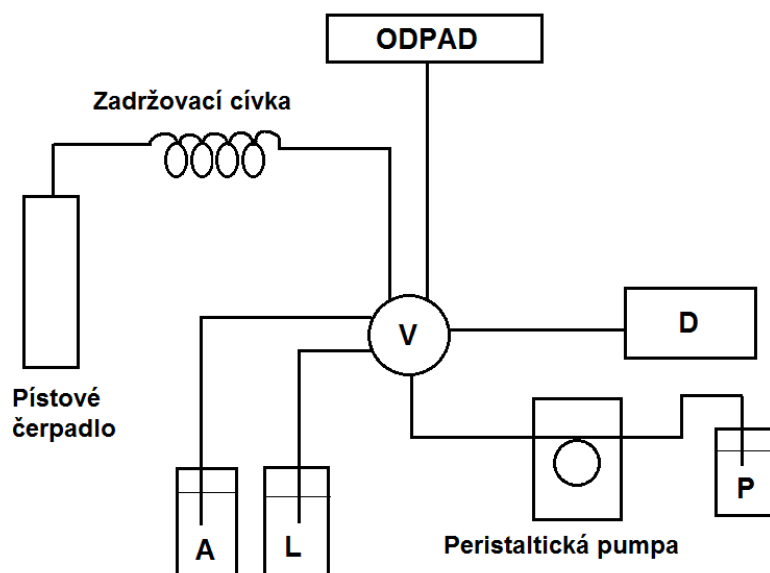
Bylo naváženo 0,24 g Co(NO₃)₂ a kvantitativně převedeno do 50 ml odměrné baňky. Roztok byl řádně promíchán a doplněn destilovanou vodou po rysku.

- *Příprava 100 ml vitamínu B₁₂ o c_(Co2+)=250 mg.l⁻¹*

Bylo naváženo 0,5750 g vitamínu B₁₂ a kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Roztok byl řádně promíchán a doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok odpovídá koncentraci 5,75 g.l⁻¹ vitamínu B₁₂ (M_r = 1355,37). Avšak tento roztok byl připraven pro účely zkoumání úspěšnosti rozkladu vitamínu B₁₂ a zkoumání množství vyvázaného Co²⁺ z jeho struktury, proto byl připraven o koncentraci, která se vztahuje na ionty Co²⁺ (M_r = 58,933). Zastoupení kobaltnatých iontů v molekule vitamínu B₁₂ tvoří 4,3 hmot. %. Koncentrace zásobního roztoku vitamínu B₁₂ pro kobaltnaté ionty odpovídala c_(Co2+) = 250 mg.l⁻¹.

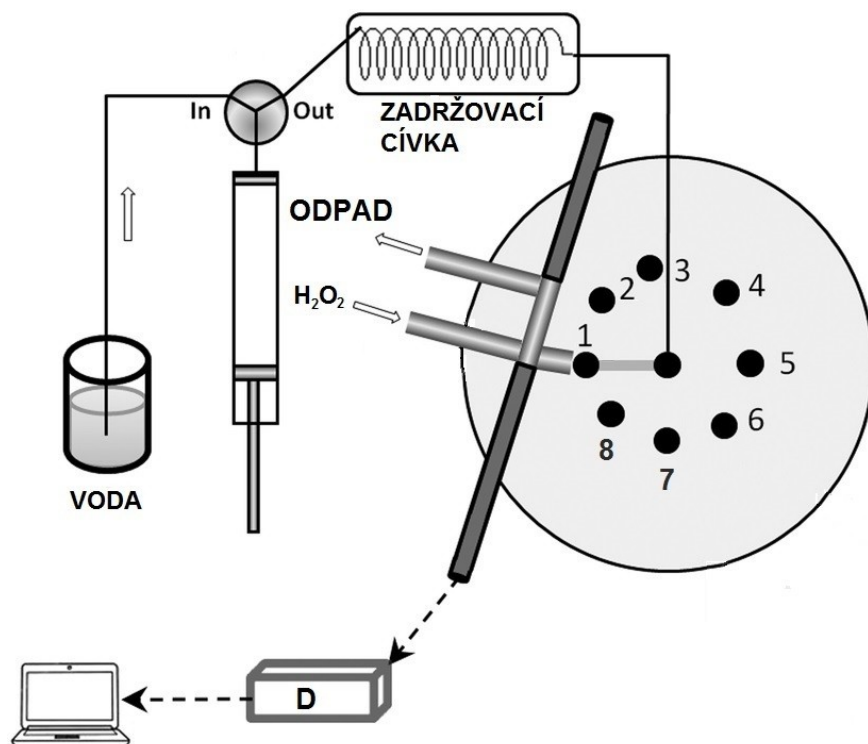
3.4. Aparatura pro SIA stanovení

Měření probíhalo na aparatuře pro sekvenční injekční analýzu s komerčním názvem FIALab-3500 od firmy FIALam, USA. Schéma aparatury je vidět na obr. 3.3.



Obr.: 3.3: Schéma SIA aparatury. *P-roztok H_2O_2 , L-roztok luminolu, V-osmicestný selekční ventil, A-analyt, D-detektor*

Roztok luminolu a analytu jsou nasávány přes vhodnou polohu osmicestného selekčního ventilu (obr.3.4) pomocí pístového čerpadla do zadržovací (mísící, reakční) cívky, kde dochází k překryvu reakčních zón v důsledku difúze a změny rychlosti a směru toku. Následně směs putuje do detekční cely, kam je zároveň přidáván i roztok peroxidu vodíku o vhodné koncentraci, a to pomocí peristaltického čerpadla, které je součástí komerční aparatury. Peristaltické čerpadlo je spuštěno těsně před vstupem reakční směsi do detekční cely tak, aby na jedné straně mohla začít probíhat chemiluminiscenční reakce a na druhé straně bylo možné detekovat signál, jehož intenzita je pomocí optického vlákna vedena do spektrofotometrického detektoru. Deset vteřin po ukončení chemiluminiscenčního záření se vypíná peristaltické čerpadlo. Časová rezerva peristaltického čerpadla je zde z důvodu promytí detekční cely od reakčních roztoků a vzorku. Celý proces analýzy může být opět opakován cca po 40 vteřinách. Dávkovací frekvence tak odpovídá téměř 90 h^{-1} .



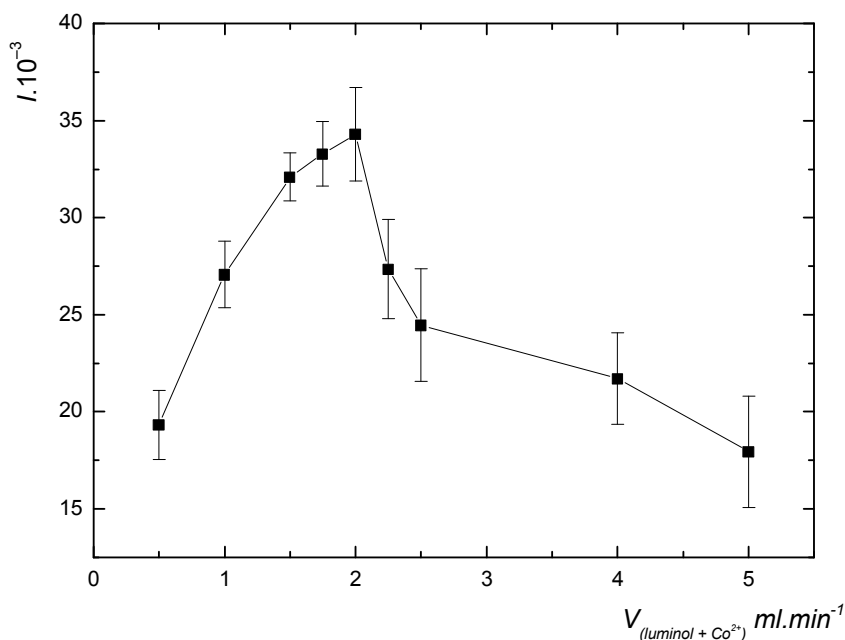
Obr. 3.4: Schéma zapojení osmicestného selekčního ventilu. *D* – detektor, *1* – vstup do detekční cely, *2* – odpad, *6* – přívod analytu, *8* – přívod roztoku luminolu.

4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

Prvním úkolem z hlediska důležitosti bylo najít optimální parametry pro metodu stanovení kobaltnatých iontů chemiluminiscenční metodou, a to z důvodu, že tyto parametry ovlivňují velikost signálu. Byly tedy nejprve hledány podmínky, při kterých je citlivost nejvyšší. Pozornost byla zaměřena na optimální hodnoty průtokových rychlostí luminolu, vzorku a peroxidu vodíku. Dále byly zjištěny optimální koncentrace peroxidu vodíku a optimální objemy luminolu a vzorku. Poté se přešlo k určení základních charakteristik pro stanovení kobaltu. Na závěr byla určena účinnost rozkladu vitamínu B₁₂ pomocí různých činidel.

4.1. Optimalizace průtokových rychlostí (luminol + vzorek)

Luminol a Co²⁺ jsou v tomto uspořádání dávkovány pomocí pístového čerpadla do detekčního prostoru osmicestného selekčního ventilu. Pomocí pístového čerpadla jsou nejprve nasáány příslušné objemy reakčních činidel do smyčky a následně jsou smíchané reakční roztoky dávkovány určitou průtokovou rychlostí do detekční cely. Průtoková rychlost byla měřena při hodnotách 0,5; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 4,0 a 5,0 ml.min⁻¹.



Obr. 4.1.: Závislost intenzity chemiluminiscence na průtokové rychlosti směsi luminol+Co²⁺.

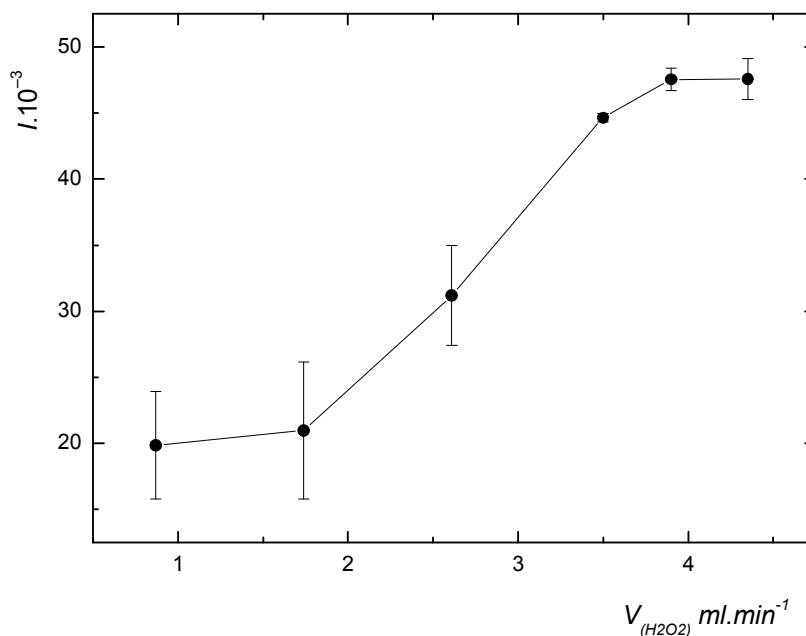
$$t_{\text{intg.}} = 1 \text{ s}; V_{(\text{Co}^{2+})} = 250 \mu\text{l}; V_{(\text{lum})} = 100 \mu\text{l}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$

$$c_{(\text{Co}^{2+})} = 1,0 \text{ g.l}^{-1}; 0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2; v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 2,2 \text{ ml.min}^{-1}$$

Jak je patrné z obr. 4.1, se vzrůstající průtokovou rychlostí reakční směsi zároveň stoupá intenzita chemiluminiscence, a to až do hodnoty $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, při které bylo dosaženo nejvyšší hodnoty chemiluminiscence. S dalším nárůstem průtokové rychlosti hodnota chemiluminiscence postupně klesá. Rychlost $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ byla použita při dalších měřeních.

4.2. Optimalizace průtokové rychlosti peroxidu vodíku

Peroxid vodíku byl v SIA uspořádání dávkován přímo do detekční cely pomocí peristaltického čerpadla, jehož průtoková rychlost byla regulována procentuálně. Experimentálně bylo zjištěno, že 100% průtoková rychlost odpovídá hodnotě $4,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Na obr. 4.2 jsou již uvedeny aktuální průtokové rychlosti v jednotkách $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 4.2: Závislost intenzity chemiluminiscence na průtokové rychlosti peroxidu vodíku

$$t_{\text{intg.}} = 1 \text{ s}; V_{(\text{Co}^{2+})} = 250 \text{ } \mu\text{l}; V_{(\text{lum})} = 100 \text{ } \mu\text{l}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$

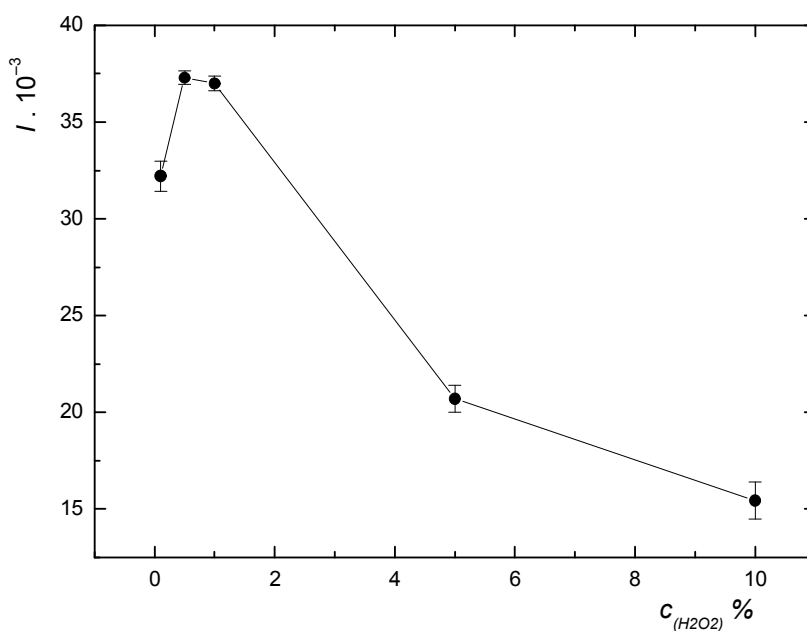
$$c_{(\text{Co}^{2+})} = 1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}; 0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2; v_{(\text{lum} + \text{Co}^{2+})} = 2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

Z obr. 4.2 je vidět, že se stoupající hodnotou průtoku směsi H_2O_2 k detektoru roste také intenzita chemiluminiscenčního záření. Nejvyšších hodnot chemiluminiscence dosahovaly shodně průtokové rychlosti $4,0$ a $4,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Pro další měření byla zvolena průtoková rychlost $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ vzhledem k nižší hodnotě chybové úsečky. Při dále se zvyšující průtokové rychlosti peroxidu vodíku byl zaznamenán pokles, který souvisí jednak se zvyšujícím se faktorem

nařazení reakční směsi v detekční cele, jednak i s rychlejším transportem reakční směsi mimo optickou dráhu snímajícího optického vlákna.

4.3. Optimalizace koncentrace peroxidu vodíku

Dalším úkolem bylo nalézt vhodné složení reakční směsi tak, aby bylo dosaženo stabilního a zároveň intenzivního emisního signálu chemiluminiscenční reakce. Byly připraveny roztoky H_2O_2 o koncentracích 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 a 10 % a všechny roztoky byly proměřeny.



Obr. 4.3: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci peroxidu vodíku

$$t_{\text{intg.}} = 1 \text{ s}; V_{(\text{Co}^{2+})} = 250 \mu\text{l}; V_{(\text{lum})} = 100 \mu\text{l}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$

$$c_{(\text{Co}^{2+})} = 1,0 \text{ g.l}^{-1}; v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}; v_{(\text{lum}+\text{Co}^{2+})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$$

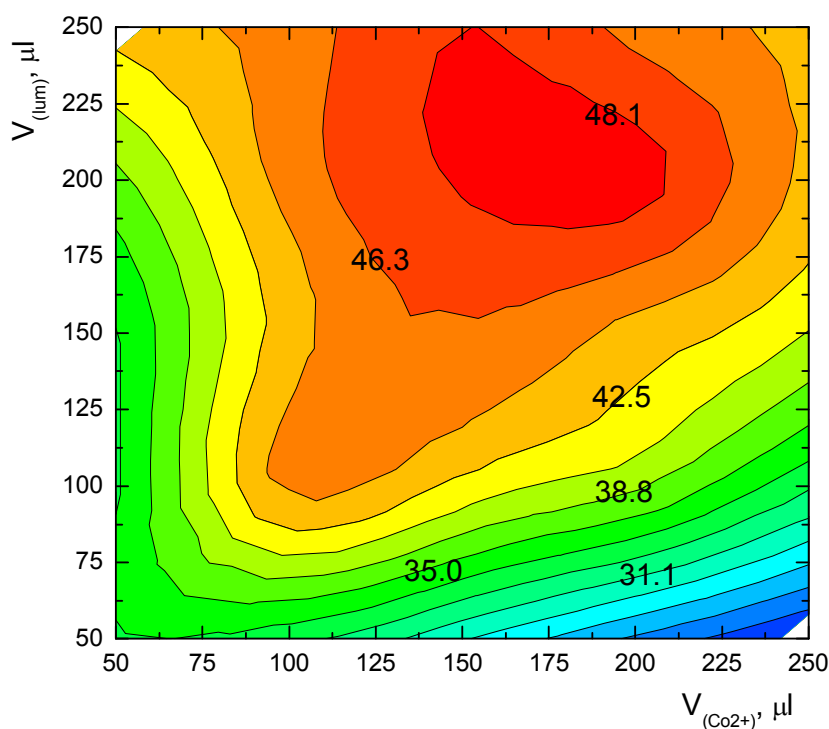
Z grafu je patrné, že intenzita chemiluminiscence stoupá pouze do hodnoty 0,5 %, kde je maximální hodnota. S dalším zvyšováním koncentrace peroxidu vodíku intenzita chemiluminiscence klesá. Pro další měření byl tedy použit 0,5 % roztok H_2O_2 . Dále byl proměřen také roztok luminolu o různých koncentracích. Po předchozím experimentu byl připraven a testován další roztok o koncentraci $8,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, tedy o poloviční koncentraci než v předchozím případě. Tento roztok vykazoval poloviční hodnotu chemiluminiscence. Závislost koncentrace luminolu na hodnotě získaného signálu je evidentní, nicméně vyšší koncentrace roztoku nebylo možné použít vzhledem k nízké rozpustnosti luminolu. Současně byl brán zřetel i na finanční náročnosti této sloučeniny.

4.4. Reakční čas

V další části práce byla měřena intenzita chemiluminiscence při různých časech setrvání reakční směsi v zadržovací smyčce. Byly proměřeny reakční časy 5; 15; 30 a 60 s. Mezi naměřenými hodnotami nebyl pozorován prakticky žádný rozdíl v intenzitě chemiluminiscenčního záření. Z toho vyplývá, že doba strávená reakční směsí v zadržovací smyčce neovlivňuje intenzitu chemiluminiscence. Důvodem může být to, že při reakci nevznikají žádné produkty či meziprodukty. Dochází pouze k promísení reagentů. K samotné reakci, při které vzniká chemiluminiscence, dochází až po smíchání s H_2O_2 v detekční cele. Z tohoto důvodu je v tomto případě použití výrazu reakční smyčka neopodstatněné.

4.5. Optimalizace reakčních objemů luminolu a vzorku

V dalším kroku bylo nutné nalézt optimální objemy reakčních činidel mísících se v zadržovací cívce. V tomto případě je to roztok luminolu a roztok vzorku – tedy kobaltnaté ionty. K pěti zvoleným objemům luminolu (50; 100; 150; 200 a 250 μl) byly testovány stejné objemy vzorku ve všech vzájemných kombinacích. Tato závislost je uvedena na obr.4.4.



Obr. 4.4: Optimalizace reakčních objemů

$$t_{\text{intg.}} = 1 \text{ s}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$

$$c_{(\text{Co}^{2+})} = 1,0 \text{ g.l}^{-1}; 0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2; v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}; v_{(\text{lum}+\text{Co}^{2+})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že maximum hodnot chemiluminiscence leží v širokém rozsahu objemů vzorku 150 – 200 μl a objemů luminolu 200 – 225 μl . Pro další měření byl vybrán objem vzorku 150 μl a objem luminolu 200 μl s ohledem na spotřebu jednotlivých reakčních činidel.

4.6. Souhrn optimalizovaných parametrů

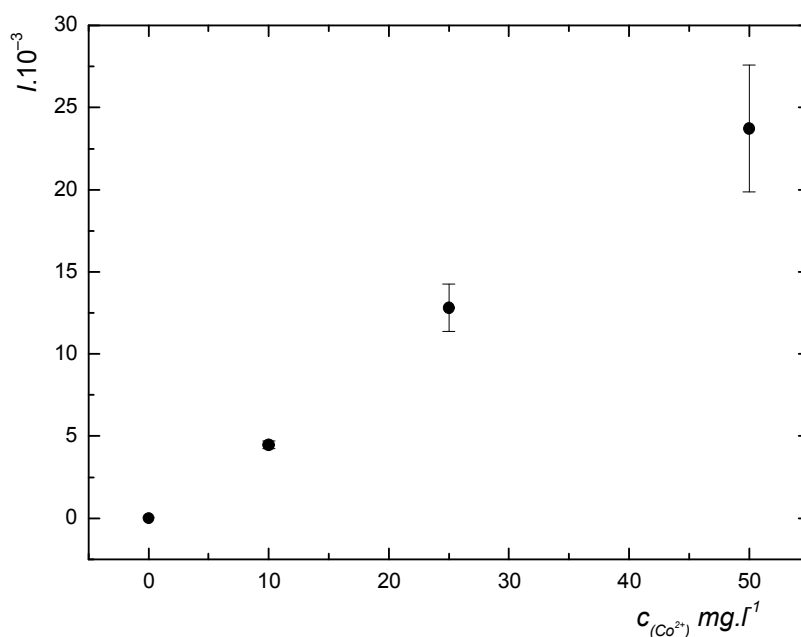
V tab. 4.1 jsou shrnuty optimální podmínky získané z výše uvedených optimalizací. Tyto podmínky byly při dalších experimentech dodržovány, aby byla zajištěna maximální citlivost stanovení.

Tab. 4.1: Výsledky optimalizace

Optimalizovaná veličina	Hodnota	Jednotka
Rychlost průtoku reakční směsi luminol + Co^{2+}	2,0	ml.min^{-1}
Průtoková rychlost H_2O_2	4,0	ml.min^{-1}
Koncentrace H_2O_2	0,5	%
Reakční objem luminolu	200	μl
Reakční objem Co^{2+}	150	μl

4.7. Základní charakteristiky stanovení kobaltu

Po dokončení optimalizace metody se přešlo k naměření kalibrační závislosti. Všechna následující měření byla prováděna za optimálních podmínek shrnutých v tab. 4.1. Byly použity roztoky o koncentracích 0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 a 1000 mg.l^{-1} , přičemž pouze roztoky do koncentrace 50 mg.l^{-1} tvořily lineární závislost. Hodnoty nad 500 mg.l^{-1} již přesahovaly limit detektoru. Kalibrační závislost kobaltnatých iontů lze vidět na obr. 4.5.



Obr. 4.5: Kalibrační závislost pro kobaltnaté ionty

$$t_{intg.} = 1 \text{ s}; V_{(Co2+)} = 250 \mu\text{l}; V_{(lum)} = 100 \mu\text{l}; c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; pH = 9,0;$$

$$c_{(Co2+)} = 1,0 \text{ g.l}^{-1}; 0,5\% H_2O_2; v_{(H_2O_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}; v_{(lum+Co2+)} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$$

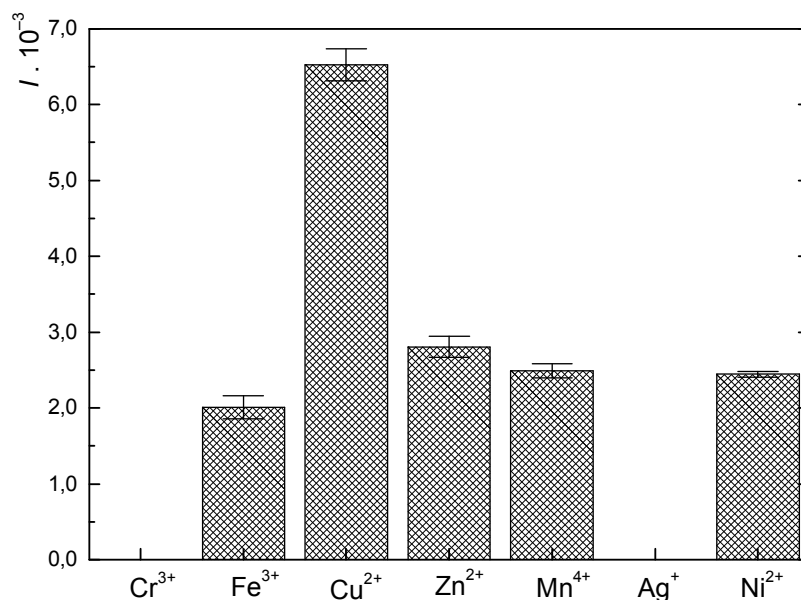
Proměřením kalibrační závislosti byly určeny základní charakteristiky stanovení (tab. 4.2). Opakovatelnost byla vypočtena z deseti měření roztoku kobaltnatých iontů o koncentraci 25 mg.l⁻¹. Citlivost je dána směrnici kalibrační závislosti. Dále bylo provedeno měření s integračním časem 2 s. Při tomto měření byla příliš vysoká hodnota chybových úseček a kalibrační závislost byla lineární pouze do koncentrace 25 mg.l⁻¹. Z těchto důvodů zde tato závislost není uvedena.

Tab. 4.2: Základní charakteristiky stanovení kobaltu

Charakteristika	Hodnota	Jednotka
Mez detekce	0,29	mg.l ⁻¹
Mez stanovitelnosti	0,98	mg.l ⁻¹
Opakovatelnost	1,8	%
Korelační koeficient	0,9975	
Citlivost	481	l.mg ⁻¹

4.8. Katalytická schopnost dalších iontů

Dále byla vyzkoušena katalytická účinnost dalších 7 prvků (Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{4+} , Ag^{+} a Ni^{2+}). Byly připraveny roztoky výše zmíněných prvků o $c = 1,0 \text{ g.l}^{-1}$ a proměřeny. Výsledek je možné vidět na obr. 4.6.



Obr. 4.6: Hodnoty intenzity chemiluminiscence pro jednotlivé prvky

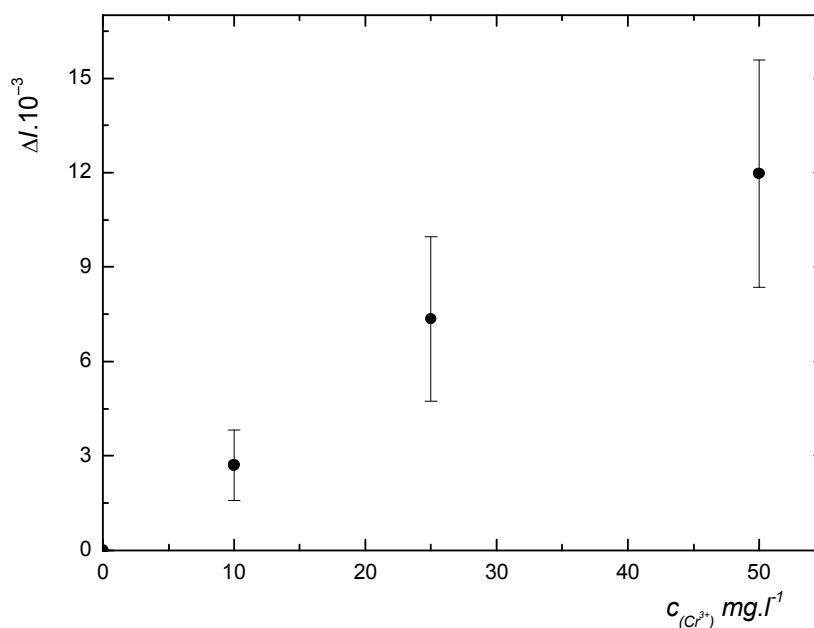
$$t_{\text{intg.}} = 1 \text{ s}; V_{(\text{prvek})} = 250 \mu\text{l}; V_{(\text{lum})} = 100 \mu\text{l}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$
$$c_{(\text{prvek})} = 1,0 \text{ g.l}^{-1}; 0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2; v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}; v_{(\text{lum+prvek})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$$

Nejvyšší katalytický účinek vykazovaly ionty měďnaté, nicméně oproti iontům kobaltnatým to byla hodnota zanedbatelná. Ionty Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{4+} , Ni^{2+} neměly významný vliv na intenzitu chemiluminiscence. Překvapivě ionty Cr^{3+} a Ag^{+} chemiluminiscenční reakci naopak inhibují. Toho by mohlo být využito v analytické chemii ke kvantitativnímu stanovení nepřímou metodou, kdy se sleduje závislost poklesu intenzity chemiluminiscence na koncentraci analytu. Proto byly v dalším kroku tyto možnosti ověřeny.

4.9. Kalibrační křivka Cr^{3+}

Jak bylo uvedeno výše, smyslem následujících dvou experimentů bylo ověřit možnosti stanovení stříbrných a chromitých iontů nepřímou metodou pomocí chemiluminiscence. Principem navrhovaného stanovení by byla v této práci využívána chemiluminiscenční detekce kobaltnatých iontů. Emisní (chemiluminiscenční) signál získaný pro směs kobaltu a luminolu při oxidaci peroxidem vodíku může být považován za signál blanku (tedy roztoku neobsahující analyt). V dalším kroku byla měřena intenzita chemiluminiscence tohoto systému s přidavkem analytu (chromité nebo stříbrné ionty) a byla vynášena závislost míry (velikosti) poklesu signálu v závislosti na koncentraci přítomného analytu. Nejprve byla pozornost věnována chromitým iontům.

Byly připraveny roztoky o koncentracích 0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 a 1000 mg.l^{-1} a proměřeny. Pouze roztoky do koncentrace 50 mg.l^{-1} tvořily lineární závislost. Jako reakční směs byly připraveny roztoky směsi luminolu ($c = 8,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) a Co^{2+} o koncentracích 25; 50 a 250 mg.l^{-1} . Lineární kalibrační závislosti bylo dosaženo pouze při koncentraci kobaltnatých iontů 50 mg.l^{-1} (obr. 4.7).



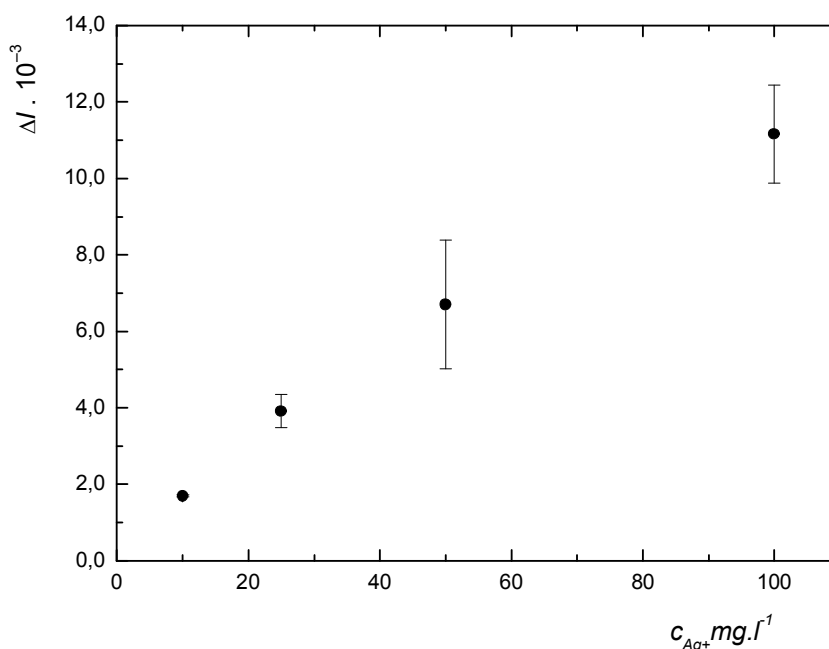
Obr. 4.7: Kalibrační závislost stanovení Cr^{3+}

$$t_{\text{intg.}} = 1; V_{(\text{Co}^{2+})} = 100 \mu\text{l}; V_{(\text{lum})} = 100 \mu\text{l}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$
$$c_{(\text{Co}^{2+})} = 100 \text{ mg.l}^{-1}; 0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2; v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}; v_{(\text{lum}+\text{Co}^{2+})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$$

Z grafu je zřejmé, že kalibraci tvoří lineární závislost a nepřímou metodu stanovení pomocí chemiluminiscenční reakce lze tedy použít pro stanovení Cr^{3+} iontů. Avšak hodnota chybových úseček je příliš vysoká. Pro uplatnění tohoto stanovení by bylo zapotřebí optimalizovat metodu pro tento konkrétní analyt. Z naměřených dat byl určen limit detekce stanovení chromitých iontů na $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ při opakovatelnosti 6,8 %.

4.10. Kalibrační přímka Ag^+

Další kation, který vykazoval inhibiční vlastnosti při chemiluminiscenční reakci luminolu s peroxidem vodíku za přítomnosti kobaltu je stříbrný kation (Ag^+). Princip proměření kalibrační závislosti je shodný s předchozím měřením. Byly připraveny roztoky o koncentracích 0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 a 1000 mg.l^{-1} a následně proměřeny. Jako reakční směs byl použit roztok luminolu ($c = 8,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) a Co^{2+} o koncentraci 50 mg.l^{-1} . Při prvním měření bylo zřejmé, že se zvyšující se koncentrací iontů Ag^+ intenzita chemiluminiscence klesá, ale mezi hodnotami nebyl dostatečný rozdíl a některé hodnoty dokonce splývaly, proto byl při dalším měření použit integrační čas 2s (obr. 4.8).



Obr. 4.8: Kalibrační závislost pro ionty Ag^+

$$t_{\text{intg.}} = 2 \text{ s}; V_{(\text{Co}^{2+})} = 100 \text{ }\mu\text{l}; V_{(\text{lum})} = 100 \text{ }\mu\text{l}; c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}; \text{pH} = 9,0;$$

$$c_{(\text{Co}^{2+})} = 50 \text{ mg.l}^{-1}; 0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2; v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}; v_{(\text{lum}+\text{Co}^{2+})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$$

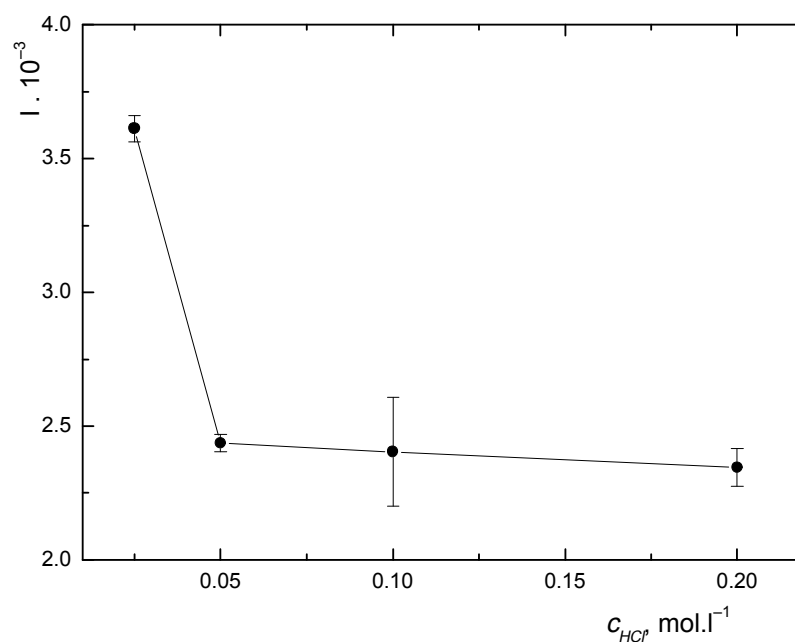
Kalibrační závislost při stanovení Ag^+ iontů nepřímou metodou je na rozdíl od chromitých iontů lineární až do koncentrace 100 mg.l^{-1} . Hodnota chybových úseček je menší a lineární závislost tvoří koncentrace od 10 do 100 mg.l^{-1} . Z naměřených dat byl určen limit detekce stanovení stříbrných iontů na $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ při opakovatelnosti 2,6 %.

4.11. Rozklady vitaminu B_{12}

Dalším úkolem této bakalářské práce bylo zjistit, zda lze optimalizovanou chemiluminiscenční metodu uplatnit pro stanovení vitaminu B_{12} . Z literární rešerše uvedené v teoretické části této práce je patrné, že podobný princip stanovení vitaminu B_{12} byl popsán několika autory. Následujícím cílem tedy bylo ověření těchto experimentů v uspořádání použitém v této bakalářské práci. Vitamin B_{12} má ve své struktuře vázaný iont Co^{2+} , který lze stanovit vhodnou reakcí po jeho kvantitativním vyvázání jako samostatný analyt. V následujících odstavcích jsou popsány některé vyzkoušené postupy rozkladu vitaminu B_{12} s navazující detekcí kobaltu.

4.11.1. Rozklad pomocí HCl

Byl připraven zásobní roztok vitaminu B_{12} o koncentraci $c_{(\text{Co}^{2+})} = 250 \text{ mg.l}^{-1}$. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven roztok o koncentraci $c_{(\text{Co}^{2+})} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$, ke kterému byla postupně přidávána kyselina chlorovodíková o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1 a $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$. Tyto roztoky byly ihned proměřeny. Pro srovnání byl proměřen roztok Co^{2+} iontů o koncentraci 50 mg.l^{-1} , jehož hodnota intenzity chemiluminiscence značí 100% účinnost rozkladu. Výsledek lze vidět na obr. 4.9.



Obr. 4.9: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci HCl

$t_{intg.} = 1 \text{ s}$; $V_{(Vit \text{ B12})} = 100 \mu\text{l}$; $V_{(lum)} = 100 \mu\text{l}$; $c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$; $pH = 9,0$;
 $c_{(Co2+)} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$; $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$; $v_{(H_2O_2)} = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}$; $v_{(lum+vit \text{ B12})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$

Nejvyšší účinnost rozkladu bylo dosaženo při koncentraci HCl $0,025 \text{ mol.l}^{-1}$, přesto byla tato účinnost pouze 17%. To je pro toto stanovení nedostačující. Tuto závislost lze vysvětlit tím, že při vyšších koncentracích HCl způsobuje změnu pH studovaného systému. Samotná oxidace luminolu je výrazně závislá na pH, kdy optimum se pohybuje kolem 8-9 jednotek. V případě použití nižších koncentrací kyseliny byl pozorován velmi nízký signál, který svědčí o nedostatečné účinnosti rozkladu.

4.11.2. Rozklad pomocí HNO_3

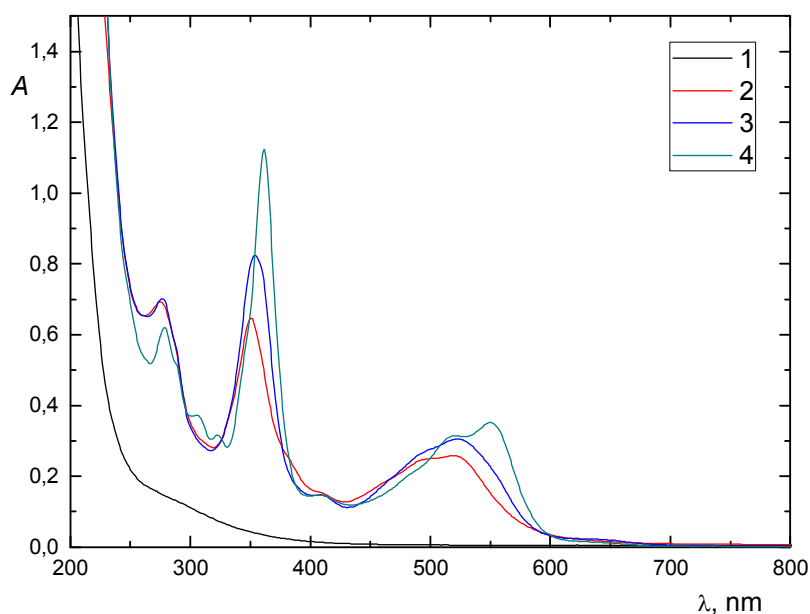
K 1,0 ml vzorku o koncentraci $c_{(Co2+)} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$ bylo přidáno 5 ml koncentrované HNO_3 a tato směs byla odpařena do sucha. K reziduu bylo přidáno 2,0 ml destilované vody a po rozpuštění byl roztok proměřen. Hodnota intenzity chemiluminiscence byla $6\,473 \pm 364$. V tomto případě byla účinnost rozkladu 30 %.

4.11.3. Rozklad pomocí UV záření

Roztok vzorku o koncentraci $c_{(\text{Co}^{2+})} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$ byl smíchán s roztokem $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ jako oxidačním činidlem o koncentracích 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0 a 10 mmol.l^{-1} a tato směs byla ozářena pod UV výbojkou (intenzivní čára při 364,7 nm) po dobu 1 min ve statickém uspořádání. Směs byla ihned proměřena. Intenzita chemiluminiscence byla nulová při všech koncentracích $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ i po následném ozařování po dobu 2 min.

Při dalším pokusu byly vylepšeny podmínky měření - směs byla ozařována v křemenné kyvetě a byla použita UV výbojka (intenzivní čára při 253,2 nm) za jinak shodných podmínek s předchozím experimentem. Ani tyto podmínky ovšem nepřispěly k rozkladu vitaminu B_{12} .

Při posledním pokusu byl použit speciální přístroj pro UV ozařování při konkrétní vlnové délce (opět při 253,2 nm), avšak doba ozařování byla přesně řízena pomocí programovatelného čerpadla. Toto uspořádání umožnilo velmi efektivní přístup UV záření ke vzorku. Vzorek proudil 3 min cívku, která byla obtočená kolem zdroje UV záření, a ihned po opuštění cívky byl proměřen. Ani při tomto experimentu nedošlo k rozkladu vitaminu B_{12} , ovšem pouhým okem byla patrná barevná změna roztoku, proto byla proměřena absorpční spektra těchto roztoků.



Obr. 4.10: Absorpční spektra roztoků vitaminu B_{12}

1 – vitamin B_{12} + 1 ml $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($c = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$) ozařováno 3 min; 2 – vitamin B_{12} ozařován 3 min; 3 – vitamin B_{12} ozařován 1 min; 4 – vitamin B_{12}

Z grafu je patrné, že došlo ke změně složení roztoku. Ale přesto, že byl použit stejný postup jako v článku Pulgarína⁽²⁷⁾, nebylo dosaženo žádných hodnot intenzity chemiluminiscence – rozklad pomocí UV záření za přítomnosti oxidačního činidla byl tedy neúspěšný.

5. ZÁVĚR

Hlavním úkolem této práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení Co^{2+} iontů. Optimální průtoková rychlost reakční směsi luminolu + Co^{2+} detekční celou byla $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, optimální průtoková rychlost H_2O_2 byla $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, optimální koncentrace H_2O_2 byla 0,5 %, optimální objem nasávaného luminolu 200 μl a roztoku vzorku 150 μl . Parametry kalibrační závislosti pro stanovení kobaltnatých iontů byly LOD $0,29 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, LOQ $0,98 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, opakovatelnost 1,8 % a citlivost stanovení $481 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Dále bylo zjištěno, že ionty Cr^{3+} a Ag^+ inhibují chemiluminiscenční reakci. Pomocí nepřímého stanovení těchto iontů byly sestaveny kalibrační závislosti. Parametry kalibrační závislosti pro chromité ionty byly LOD = $0,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a opakovatelnost 6,8 % a pro stříbrné ionty LOD = $1,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a opakovatelnost 2,6 %.

Další částí práce bylo provedení rozkladů vitamínu B_{12} pro jeho další stanovení. Největší účinnosti rozkladu bylo dosaženo při použití koncentrované HNO_3 . Naopak při rozkladu pomocí UV záření za přítomnosti oxidačního činidla nebylo dosaženo žádné účinnosti, což je v rozporu s prací J.A.M. Pulgarína⁽²⁷⁾.

6. BIBLIOGRAFIE

1. Růžička J.; Hansen E. H.: *Analytica Chimica Acta* **78**, s. 145-157 (1975).
2. Barek J. a další: *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha, Karolinum 2005
3. Cerda V. a další: *Talanta* **50**, s. 695-705 (1999)
4. Opekar F. a další: *Základní analytická chemie*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2010
5. Růžička, J.; Marshal, L. G. D.: *Analytica Chimica Acta* **237**, s. 329-343 (1990)
6. Růžička J.; Hansen E. H.: *TrAC* **17**, s. 69–73 (1998)
7. FIALab; *Sequential Injection Analysis*. Dostupné z URL:
<http://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf> [cit.7.5.2015]
8. Pimenta A.M.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, s. 16–34 (2006)
9. Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: *Chemické listy* **93**, s. 354-359 (1999)
10. Paraskevas D.: *Analytica Chimica Acta* **588**, s. 1-9 (2007)
11. Mesquita, R. B. R.; Rangel, A. O. S. S.: *Analytica Chimica Acta* **648**, s. 7-22 (2009)
12. Holzbecher Z.: *Luminiscenční analyza*. 1. vyd. Praha, ČSAV (1957)
13. Šimsa, D.; Skopal, J.: *Chem. Listy*. **102**, s. 1017-1019 (2008)
14. Barni, F. a další: *Talanta*. **72**, s. 896-913 (2003)
15. Proescher, F.; Moody, A. M.: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **24**, s. 1183-1189 (1939)
16. Randaccio, L.; Geremia, S.; Wuerges, J.: *Journal of Organometallic Chemistry* **692**, s. 1198-1215 (2007)
17. Kolektiv autorů: *Biochemie Základní kurz*. 3. vyd. Praha Karolinum 2005
18. McMurry J.: *Organická chemie*. 1. vyd. Brno, VUTIUM 2004
19. Velíšek, J.: *Chemie potravin*. 2. vyd. Tábor, Ossis 2002
20. Sakai, T.; Suzui, .M; Higuchi, H.: *Analytical Sciences* **13**, s. 131-136 (1997)
21. Vinas, P. a další: *Analytica Chimica Acta*. **318**, s. 319-325 (1996)
22. Refera, T.; Chandravanshi, B. S.: *Electroanalysis*. **10**, s. 1038-1042 (1998)
23. Stefova, M.; Stafilov, T.: *Analytical letters*. **30**, s 2723-2731 (1997)
24. Gonzales, L.: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **20**, s 487-492 (1999)
25. Song, Z.; Hou, S.: *Analytica Chimica Acta*. **488**, s. 71-79 (2003)
26. Han, L. a další: *Spectrochimica Acta*. **82**, s. 146-152 (2011)
27. Pulgarín, J. A. a další.: *Luminescence*. **26**, s. 536-542 (2011)
28. Šimůnek O.: *Chemiluminescence*. Dostupné z URL:
<http://chemiluminescence.xf.cz/chemiluminescence_II_final.pdf> [cit. 7.5.2015]